

University of Groningen

How lactobacilli synthesize inulin

Anwar, Munir Ahmad

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2010

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Anwar, M. A. (2010). *How lactobacilli synthesize inulin: characterization of fructosyltransferase enzymes*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 7

Samenvatting en conclusies

Fructanen zijn polysacchariden opgebouwd uit de glycopyranosyl eenheid fructose en worden gesynthetiseerd uit sucrose door zowel micro-organismen als planten. Microbiële fructanen zijn exopolysaccharides (EPS), wat wil zeggen dat ze geproduceerd worden buiten de microbiële cel. Sommige, maar zeker niet alle, micro-organismen kunnen fructanen vormen. Inuline en levan zijn lineaire fructan polymeren waarin de fructose eenheden verbonden zijn door β (2-1) en β (2-6) glycosidische bindingen. Het aantal fructose monomeren per fructan molecuul wordt de polymerisatiegraad (DP) genoemd. Korte oligosacchariden zijn beter bekend als fructo-oligosacchariden (FOS). Fructan polymeren kunnen microbiële cellen in hun natuurlijke omgeving beschermen tegen uitdroging, fagocytose, protozoa en faag aanvallen, antibiotica en toxische stoffen, en stress als gevolg van bevriezing. Daarnaast kunnen fructanen helpen bij de hechting van cellen aan vaste oppervlakken in hun natuurlijke milieu, en het maken van interacties tussen bacteriën onderling en/of met hun gastheer.

Micro-organismen beschikken over twee verschillende typen fructan vormende enzymen, levansucrase en inulosucrase, deze worden ook wel fructansucrases (FS) of fructosyltransferases (FTF) genoemd, ze polymeriseren de fructose van sucrose tot levan of inuline. Levansucrase genen/enzymen worden gevonden in zowel Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën, terwijl inulosucrase genen/enzymen tot nu toe alleen gevonden zijn in de melkzuurbacteriën (LAB) *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc citreum* CW28, *Lactobacillus reuteri* 121, *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, *Lactobacillus gasseri*, en in de Gram-positieve bacterie *Bacillus* sp.

De inulosucrase (EC 2.4.1.9) en levansucrase (EC 2.4.1.10) enzymen behoren tot glycoside hydrolase familie 68 (GH68), die samen met familie GH32 clan GH-J vormen (<http://www.cazy.org>). Bij het begin van dit promotieonderzoek waren 3D structuren bekend van zes familie GH32 eiwitten en twee familie GH68 eiwitten, namelijk SacB levansucrase van *B. subtilis* en LsdA levansucrase van *Gluconacetobacter diazotrophicus*. De 3D structuren van beide levansucrase hebben de relatief zeldzame β_5 -propeller topologie, met hun katalytisch centrum in een diepe negatief geladen pocket, die omgeven is door geconserveerde aminozuur residuen. De fructosyl eenheid van sucrose bindt onder in deze pocket, en dicht bij de katalytische residuen Asp86, Asp247 en Glu342 (residue nummers van *B. subtilis* SacB).

Alle bekende levansucrases en inulosucrases van LAB hebben een aminozuurvolgorde die minimaal 60% gelijk is, met een vergelijkbare domein organisatie: (i) een N-terminaal signaal peptide, (ii) een N-terminaal variabel domein, (iii) een katalytisch domein, en (iv) een C-terminaal domein, waarin vaak een celwand anker sequentie aanwezig is. Het signaal peptide zorgt voor de secretie van het enzym, terwijl de functie van het N-terminale variabele domein nog onbekend is. Het katalytische domein is ongeveer 450-500 aminozuren groot en is het best bestudeerde onderdeel van FTF enzymen. Dit domein bevat de drie katalytische residuen: een Asp nucleofiel, een Glu algemeen zuur/base katalysator en een Asp transitiestaat toestand stabilisator. Het katalytische domein bevat ook een aantal aminozuren dat zorgt voor de specificiteit en efficiëntie van transfructosylation, of te wel het groeien van de fructan ketens. Het C-terminale domein heeft een variabele lengte en een nog onduidelijke functie; dit domein kan een celwand-bindend subdomein hebben bestaande uit (i) een spacer regio (50 tot 125 aminozuur residuen) rijk aan Pro / Gly en / of Thr / Ser residuen, (ii) een LPXTG / LPKAG sortase motief, (iii). een opeenvolging van hydrofobe PXX motieven.

Bacteriële FTF's kunnen twee soorten reacties katalyseren, namelijk de hierboven genoemde transglycosylering, en simpelweg hydrolyse van sucrose. FTF enzymen gebruiken een ping-pong reactie mechanisme waarin eerste de glycosidische binding in sucrose verbroken wordt en een covalent enzym-fructosyl complex gevormd wordt. Vervolgens wordt deze fructosyl eenheid gekoppeld aan de fructose eenheid van sucrose (FOS formatie), of aan een groeiende fructan keten (polymeer vorming). In de hydrolyse reactie wordt de fructosyl eenheid gekoppeld aan water hetgeen resulteert in de vorming van fructose en glucose uit sucrose.

Ondanks de gelijkenis in de aminozuursequenties, en hun overeenkomstige domein organisatie, vormen levansucrase en inulosucrase verschillende producten, namelijk $\beta(2-6)$ versus $\beta(2-1)$ fructan polymeren. Daarnaast is er een verschil in de grootte van de geproduceerde fructanen, de hoeveelheid FOS gevormd, en wordt een relatief lage transglycosylation / hydrolyse ratio waargenomen voor levansucrases ten opzichte van inulosucrases. Voor de aanvang van dit promotieonderzoek waren er slechts enkele inulosucrase enzymen bekend, en de beschikbare diversiteit aan FTF enzymen was onvoldoende om aminozuur residuen te kunnen selecteren die verantwoordelijk zijn voor de

functionele verschillen tussen levansucrases en inulosucrases. Eerdere studies hadden hoofdzakelijk betrekking op de bepaling van de rol van aminozuren die zowel in levansucrases als in inulosucrases gevonden worden. Mede hierdoor was er relatief weinig bekend over de verschillen in werking van inulosucrases en levansucrases, te meer daar er nog geen 3D structuur van een inulosucrase eiwit voorhanden was. Dit promotieonderzoek beoogde om meer inulosucrase enzymen te identificeren en te karakteriseren, en om de 3D structuur van een inulosucrase eiwit op te helderen om meer inzicht te vergaren in de (verschillen in) structuur-functie eigenschappen van deze FTF enzymen.

Dit proefschrift beschrijft (i) de karakterisering van *ftf*/FTF genen/enzymen uit een *Lb. johnsonii* en drie *Lb. gasseri* stammen, (ii) de opheldering van een 3D-structuur van de inulosucrase InuJ uit *Lb. johnsonii* NCC533 (in samenwerking met Tjaard Pijning en Bauke Dijkstra, Biofysische Chemie, Rijksuniversiteit Groningen), (iii) mutagenese studies aan inulosucrase enzymen gericht op aminozuur residuen die verschillend zijn in de inulosucrase en levansucrase eiwitten.

Karakterisering van fructansucrase genen/enzymen uit lactobacilli (Hoofdstukken 2 en 3)

Diverse probiotische *Lactobacillus* stammen werden geëvalueerd voor fructan synthese en de aanwezigheid van *ftf* genen, wat leidde tot de identificatie en karakterisering van drie nieuwe inulosucrase genen en enzymen. *Lb. johnsonii* NCC 533 is de eerste bacterie waarvoor synthese van inuline en FOS is aangetoond *in situ* (Hoofdstuk 2). Vervolgens werden drie *Lb. gasseri* stammen bestudeerd en aangetoond dat er aanzienlijke heterogeniteit is tussen hun *ftf*/FTF genen/enzymen en hun gevormde fructan producten (Hoofdstuk 3). *Lb. gasseri* DSM 20604 bleek inuline en FOS te maken *in situ*, terwijl *Lb. gasseri* DSM 20077 levan en GF2 type FOS produceerde. De *Lb. gasseri* DSM 20604 stam is uniek qua FOS producten, variërend van DP2 tot DP13. De derde stam, *Lb. gasseri* DSM 20243, bleek niet in staat te zijn om FOS of fructan polymeer te maken, hetgeen verklaard kon worden met de waarneming dat deze stam een *ftf* gen (hier aangeduid als *inuGA*) met een prematuur stop codon heeft waardoor deze niet meer actief was (zie hieronder).

Voor een verbeterde eiwit expressie werden de genen (zonder signaal peptide, gedeeltelijk zonder de N-terminale variabele regio en met een ingekort C-terminaal domein)

gekloneerd en tot expressie gebracht in *E. coli*. Op deze manier werd ook voldoende enzym verkregen voor kristallisatie pogingen (Hoofdstuk 4).

De inulosucrase eiwitten van *Lb. Johnsonii* en *Lb. gasseri* DSM 20243 en 20604 vormen een cluster in de fylogenetische boom van de bacteriële FTF enzymen (Hoofdstuk 1, Fig. 2). Bovendien delen deze inulosucrase eiwitten (uitgezonderd InuGB), samen met LevG, een gemeenschappelijke celwand anker motief LPKAG, terwijl LPQTG aanwezig is in FTF's van andere LAB. Het effect van een onvolledige celwand anker domein en het ontbreken van het LPXTG / LPKAG motief in *Lb. gasseri* DSM 20604 InuGB inulosucrase was duidelijk waarneembaar in de locatie van dit enzym: het was namelijk niet gebonden aan de celwand (zoals het levansucrase van *Lb. gasseri* 20077) maar vrij aanwezig in de supernatant (Hoofdstuk 3, Tabel 4).

Een ander interessant aspect van deze *Lb. gasseri* stammen is dat ze niet in staat zijn raffinose te gebruiken als koolstofbron, terwijl de in *E. coli* geproduceerde en gezuiverde recombinante sucrose enzymen dit wel als substraat gebruiken (Hoofdstuk 3, Fig. 4a). Echter, alle drie stammen toonde overvloedige groei op de MRS-raffinose medium aangevuld met sucrose, daarmee aantonende dat de groei niet geremd wordt door raffinose.

Calcium ionen zijn essentieel voor een optimale enzymactiviteit en stabiliteit van de recombinante FTF enzymen onderzocht in dit proefschrift, wat in overeenstemming is met de eigenschappen van eerder beschreven FTF enzymen. Een ander gemeenschappelijk kenmerk van de recombinant inulosucrase enzymen bestudeerd in dit proefschrift is dat de totale en transfructosylering activiteiten van de enzymen niet kon worden verzadigd met substraat sucrose. Een mogelijke verklaring voor deze waarneming bij InuJ van *Lb. johnsonii* is dat de FOS oligosacchariden die in het begin van de reactie gevormd worden betere acceptor substraten zijn dan de groeiende polysaccharide keten (Hoofdstuk 2, Fig. 3). De vergaarde kinetische gegevens waren in overeenstemming met de beschikbare literatuur en lieten andermaal zien dat levansucrases relatief een meer hydrolytisch karakter hebben dan inulosucrases.

De aldus verkregen FTF aminozuur sequenties van *Lactobacillus* stammen werden vergeleken met de sequenties van andere inulosucrases en met levansucrases van Gram-positieve bacteriën om residuen te identificeren voor mutagenese studies (Hoofdstuk 5).

3D structuur van het *Lb. johnsonii* NCC 533 inulosucrase (InuJ) eiwit (Hoofdstuk 4)

De 3D structuur van *Lb. johnsonii* inulosucrase (InuJ) werd opgehelderd tot een resolutie van 1,75 Å, en dat van de inactieve mutant D272N tot 2,69 Å (Hoofdstuk 4). Deze allereerste 3D structuur van een inulosucrase eiwit toont de typische topologie van een β 5-propeller (5 bladen rondom een centrale as), ook aanwezig in het katalytisch domein van levansucrases (familie GH68). De centrale trechter gevormd door de β 5-propeller heeft een hoge structurele overeenkomst met de bekende levansucrase structuren (SacB en LsdA). Opmerkelijk is dat de subsite -1 (donor subsite) van InuJ vrijwel identiek is aan die van SacB en LsdA. De drie katalytische residuen van InuJ (D272, D425, E524) hebben dezelfde relatieve posities en oriëntaties als in SacB en LsdA (Hoofdstuk 4, Fig. 5). Deze sterke overeenkomsten in de -1 subsite is verklaarbaar, aangezien deze dezelfde functie heeft in levansucrases en inulosucrases, namelijk de glycosidische binding van sucrose splitsen, en de fructosyl eenheid vervolgens koppelen aan een acceptor substraat. Het feit dat sucrose gebonden in InuJ een vergelijkbare oriëntatie heeft als in SacB, plus de overeenkomsten in de -1 en +1 subsites, suggereert dat de binding en de splitsing van substraat in inulosucrase en levansucrase enzymen waarschijnlijk op een vergelijkbare manier verlopen.

De oriëntatie van het binnenkomende acceptor substraat zal uiteindelijk bepalen welk type glycosidische binding gevormd wordt. Functionele verschillen kunnen daarom verwacht worden op de +2 en/of hogere acceptor substraat bindingsplaatsen. Er werden enkele belangrijke verschillen waargenomen tussen de acceptor subsite architectuur van InuJ en levansucrase eiwitten (Hoofdstuk 4, Fig. 4, Tabel 2): Een andere positie van R623 in InuJ, R545 (in InuJ) in plaats van een lysine in SacB, en de afwezigheid in InuJ van bepaalde residuen die water-gemedieerde contacten leveren bij de +2 acceptor subsite van SacB. Hierdoor verschillen de eigenschappen van de acceptor bindingsplaatsen in beide type enzymen. Echter, uit sequentie analyse blijkt dat R623 en R545 niet alleen geconserveerd zijn in inulosucrases, maar ook aanwezig zijn in verschillende levansucrases. Dit geeft aan dat andere structurele kenmerken ook belangrijk moeten zijn voor het bepalen van de product specificiteit. De grootste gelijkenis hebben InuJ en SacB in de β -propellerbladen, structurele verschillen waren voornamelijk te vinden in een aantal andere structurele elementen. Bijvoorbeeld, helix α 7 van InuJ, gelegen in de lus tussen β -strengen 4B en 4C en parallel aan helix α 3, is afwezig in SacB en LsdA.

Voor verschillende levansucrases is aangetoond dat ze 1-kestose synthetiseren uit sucrose, dat is een trisaccharide met twee $\beta(2-1)$ gekoppelde fructose-eenheden. Er wordt gesuggereerd dat levansucrases 1-kestose produceren als bijproduct en dat hier verder geen fructose residuen aan gekoppeld worden, terwijl 6-kestose het belangrijkste product zou zijn uiteindelijk leidend tot de vorming van levan. Echter, alleen voor het *Bacillus megaterium* levansucrase is aangetoond dat 6-kestose een van de gesynthetiseerde producten is. Interessant is dat de *B. megaterium* levansucrase gegevens laten zien dat 1-kestose verbruikt wordt en dat er accumulatie van 6-kestose lijkt plaats te vinden. Een andere studie toonde aan dat de levansucrase van *Lb. reuteri* 121 1-kestose gebruikt om langketenige FOS te produceren. De 3D structuur van InuJ suggereert inderdaad dat de eerste reactie stap in inulosucrase en levansucrase vergelijkbaar is. Om de details van de verschillen in product specificiteit van inulosucrases en levansucrases beter te kunnen verklaren zouden 3D-structuren met gebonden GF2 of GF3 acceptor substraten meer inzicht kunnen verschaffen.

Studies aan inulosucrase mutanten (Hoofdstuk 5)

Slechts een paar inulosucrase enzymen waren beschreven voordat het werk beschreven in dit proefschrift werd gestart. Karakterisering van de inulosucrases van *Lb. johnsonii* (Hoofdstuk 2) en *Lb. gasseri* stammen DSM 20243 en 20604 (Hoofdstuk 3) maakte een meer gedetailleerde vergelijking mogelijk van levansucrase en inulosucrase enzymen voor identificatie van aminozuren die sterk zijn geconserveerd in inulosucrases, maar niet in levansucrases. De Inu en Lev enzymen van *Lb. reuteri* 121 werden geselecteerd voor deze vergelijking, omdat zij beide worden geproduceerd door hetzelfde organisme en nauw aan elkaar verwant zijn (86% vergelijkbaar in 768 aminozuur residuen). Aangezien deze studie gestart werd voordat de 3D structuur van InuJ opgehelderd was (Hoofdstuk 4), zijn de mutatie doelen in Inu enkel geselecteerd op basis van de vergelijking van levansucrase en inulosucrase enzymen uit melkzuurbacteriën. De verkregen resultaten konden wel nader verklaard worden aan de hand van de recent opgehelderde InuJ 3D structuur. Puntmutaties werden geïntroduceerd in Inu op posities die sterk geconserveerd zijn in inulosucrases, maar verschillend/variabel in levansucrases (Hoofdstuk 5, Tabel 1). Ook mutanten met meerdere aminozuur residue veranderingen (GM1-GM4) werden geconstrueerd, de locatie van deze aminozuren in de actieve site trechter in ogenschouw

nemende. De geselecteerde residuen waren niet eerder aan een mutagenese studie onderworpen.

Plaatsgerichte mutagenese van specifieke residuen in *Lb. reuteri* 121 Inu, gevolgd door expressie in *E. coli*, zuivering en biochemische karakterisering van deze 19 mutante enzymen, liet zien dat een aantal van deze residuen een duidelijke functionele rol vervullen in de reactie en product specificiteit van inulosucrase. Bijvoorbeeld, de mutatie van residu G416, aanwezig op de rand van de actieve site pocket in lus 415-423 (vergeleken met de *Lb. Johnsonii* NC 533 InuJ 3D-structuur, Hoofdstuk 4), in glutamaat verhoogde de hydrolytische activiteit 2-voudig, zonder significante veranderingen in de transglycosylerings activiteit. De meervoudige mutant GM4 (T413K, K415R, G416E, A425P, S442N, W486L, P516L), die ook drie residuen uit de hierboven genoemde lus bevat, synthetiseerde alleen 1-kestose, zij het met een lage efficiëntie. Mutatie A538S, gelegen achter de algemene zuur/base katalysator, verhoogde de enzymactiviteit 2 tot 3 keer. Uit de InuJ 3D-structuur bleek dat InuJ een unieke helix $\alpha 7$ heeft, welke afwezig is in de levansucrases van SacB en LsdA (Hoofdstuk 4). Mutaties in aminozuur residuen in blad 4, welke ook de unieke helix $\alpha 7$ bevat, lieten een duidelijk effect zien op de transglycosylerings activiteit en het FOS product profiel. Vooral mutaties in N543, een residue dat waterstofbruggen vormt met de aangrenzende arginine R544 (dichtbij subsites +1 en/of +2), resulteerde in verminderde synthese van FOS in vergelijking met het wild-type enzym.

Conclusies en vooruitzichten voor de toekomst

Melkzuurbacteriën zijn aanwezigheid in ons voedsel en ze leveren een bijdrage aan een gezonde microflora van menselijke slijmvliezen. In het hier gepresenteerde werk beschrijven we drie inulosucrase (en een levansucrase) enzymen van bij de mens voorkomende lactobacillen. Slechts drie inulosucrase enzymen waren gekarakteriseerd voordat het werk beschreven in dit proefschrift werd gestart. In ons onderzoek aan *Lb. johnsonii* NC 533 en *Lb. gasseri* DSM 20604 is voor het eerst *in situ* productie van inuline en inuline FOS bij lactobacillen aangetoond, hetgeen hun probiotische potentie onderbouwt en versterkt. In deze studies werden ook enkele fundamentele kenmerken van deze bacteriën aan het licht gebracht. De aanwezigheid van een prematuur stop codon in het *Lb. gasseri* 20243 inulosucrase gen, en de abrupte beëindiging (vóór het celwand anker motief) van het

inulosucrase gen van *Lb. gasseri* DSM 20604, lieten zien dat genetische modificaties in de ecologische niches van deze lactobacillen frequent voorkomen. Het effect van deze genetische veranderingen komt het duidelijkst tot uiting in hun fysiologische eigenschappen. Stam DSM 20243 kon geen fructan en FOS produceren, terwijl stam DSM 20604 overwegend niet-celwand gebonden inulosucrase produceerde. *In vivo* herstel van de normale *ftf* gen functies door het verwijderen van deze stop codons kunnen deze fysiologische kenmerken verder bevestigen.

De inulosucrase enzym sequenties die beschikbaar kwamen werden gebruikt om aminozuren die sterk zijn geconserveerd in inulosucrases, maar niet in levansucrases, te identificeren. Deze residuen werden aan plaats specifieke mutagenese studies onderworpen om hun functionele rol te bepalen. De resultaten van deze mutagenese studie zorgden voor een beter fundamenteel begrip over de verschillen tussen de inulosucrase en levansucrase enzymen, en zijn belangrijk voor de synthese van inulosucrase mutanten met een hogere transglycosylerings specificiteit, hogere katalytische snelheid, en een verschillende FOS/polymeer grootte verdeling. Tot slot, resulteerden deze studies in de opheldering van de eerste 3D structuur van een inulosucrase (InuJ) eiwit (in samenwerking met Tjaard Pijning en Bauke Dijkstra, Biofysische Chemie, Rijksuniversiteit Groningen). Hoewel de -1 donor subsites van InuJ en *B. subtilis* SacB vrijwel identiek zijn, werden structurele verschillen waargenomen in een aantal andere elementen. De structurele basis voor de verschillen in product specificiteit (β (2-1) of β (2-6) verbindingen) van inulosucrase en levansucrase enzymen is onderwerp van ons vervolgonderzoek. Deze inzichten zouden verschaft kunnen worden door middel van 3D structuren van InuJ met gebonden acceptor substraten (bijv. kestose of nystose). Dergelijke experimenten worden momenteel uitgevoerd, met als doel de structuur van deze complexen te bepalen.

